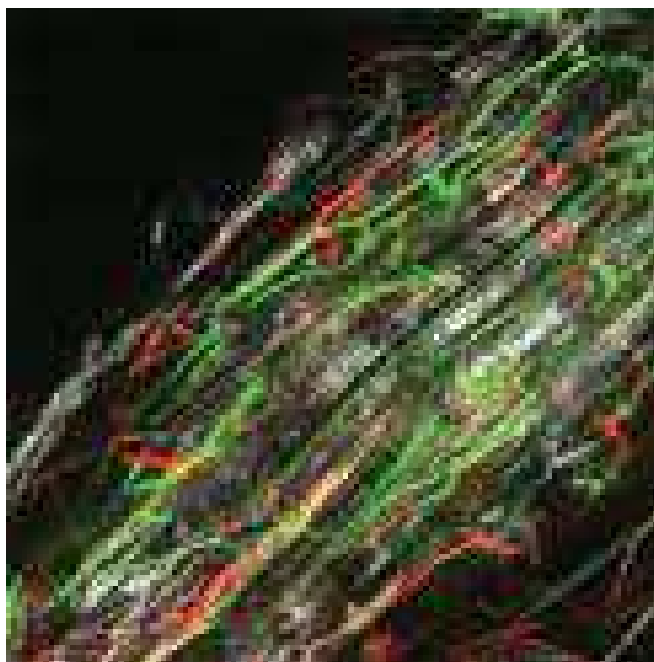


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



Πτυχιακή μελέτη

Η επίδραση των ενδογενών επιπέδων φυτοορμονών στην ικανότητα αποικισμού φυτών ντομάτας (αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων) από ένα μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*

Φοιτήτρια: Βηθλεέμ Αναστασιάδου

2010

Η επίδραση των ενδογενών επιπέδων φυτοορμονών στην ικανότητα αποικισμού φυτών ντομάτας (αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων) από ένα μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη : Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Καρπούζας Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος: Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, του Τμήματος Γεωπονίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου τη καρδιά την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και Επιβλέπουσα της πτυχιακής αυτής εργασίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την παροχή επιστημονικής γνώσης που μου προσέφερε καθώς επίσης και για την κατανόηση που επέδειξε στα όποια τυχόν προβλήματα και αν παρουσιάστηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Ένα επίσης πάρα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην συνάδερφό μου και μεταπτυχιακή φοιτήτρια Δάφνη Γεωργιάδου για την απεριόριστη υπομονή της και την καθοδήγηση που μου προσέφερε, χωρίς την βοήθεια της οποίας η εργασία αυτή ίσως να μην είχε ολοκληρωθεί.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όσους συναδέλφους του εργαστηρίου με βοήθησαν είτε ηθικά είτε πρακτικά για την εκπόνηση αυτής εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ σε αυτούς που τόσα χρόνια με στηρίζουν σε όλες μου τις προσπάθειες, σε αυτούς που πάντα με αγαπούν· στην οικογένειά μου, καθώς επίσης και τον άνθρωπο που με στήριξε με τόση υπομονή και μου έδωσε δύναμη να συνεχίσω τη προσπάθειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	7
ΜΕΡΟΣ 1°: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	9
ΜΕΡΟΣ 2°: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΥΚΗΤΩΝ	
2.1 Ταξινόμηση μυκήτων.....	13
2.1.1 Παθογόνοι μύκητες των φυτών.....	13
2.2 Ανταγωνιστικότητα μυκήτων.....	13
2.3 Ανταγωνιστικοί μύκητες.....	14
2.3.1 <i>Trichoderma.sp.</i>	15
2.3.2 Στελέχη <i>Fusarium oxysporum</i>	15
2.3.3 <i>Fusarium solani</i> K.....	16
ΜΕΡΟΣ 3°: Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i>	18
ΜΕΡΟΣ 4°: ΤΟ ΑΜΠΙΣΙΣΙΚΟ ΟΞΥ	
4.1 Μονοπάτι Βιοσύνθεσης.....	20
4.2 Ο φυσιολογικός ρόλος του αμπισισικού οξέος.....	22
4.3 Πρόσφατα αποτελέσματα δράσης.....	23
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα ενδοφυτικό στέλεχος μύκητα, το *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), είναι ικανό να επιφέρει προστασία στα φυτά από διάφορα παθογόνα. Ένα πολύ σημαντικό παθογόνο που προσβάλλει τα φύλλα και της ρίζες φυτών τομάτας είναι το *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (FORL), το οποίο έχει αποδειχτεί πως δρα ανταγωνιστικά με τον FsK, ο οποίος αποικίζει τις ρίζες των φυτών τομάτας και μειώνει τη παθογόνο δράση του FORL. Η διαδικασία αυτή βρέθηκε πως επηρεάζεται από την παρουσία αιθυλενίου. Σκοπός αυτής της εργασίας λοιπόν ήταν να διερευνηθεί εάν η ορμόνη των φυτών, αμπισικό οξύ (ABA) επηρεάζει το μηχανισμό δράσης του FsK έναντι του παθογόνου FORL. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά μεταλλαγμένης σειράς *sitiens* τα οποία είναι ελλιπή ως προς τη σύνθεση του αμπισικού οξέος, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα φυτά αγρίου τύπου Rheinlandes Ruhm (RR). Τα αποτελέσματα έδειξαν (α) το ABA οριακά αυξάνει την ικανότητα μόλυνσης των φυτών από το παθογόνο FORL, (β) η παρουσία του αμπισικού οξέος επηρεάζει τον μηχανισμό με τον οποίο δρα ανταγωνιστικά ο FsK τον παθογόνο μύκητα καθώς τα φυτά με γενότυπο αγρίου τύπου προστατεύονται από την ασθένεια που προκαλεί το παθογόνο παρουσία του ανταγωνιστικού μύκητα FsK ενώ τα μεταλλάγματα της σειράς *sitiens* δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά είτε έχουν εμβολιασθεί και με τον FsK είτε όχι. Εφαρμόστηκε επίσης εξωγενής προσθήκη στα και στις δύο σειρές ώστε να διερευνηθεί εάν μία εξωγενής προσθήκη είναι ικανή να αναπληρώσει την ενδογενή βιοσύνθεσή του. Παρατηρήθηκε, ότι η εξωγενής προσθήκη της φυτοορμόνης, τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα φυτά της μεταλλαγμένης σειράς δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη ασθένειας αλλά ούτε και τη δράση του ανταγωνιστικού μύκητα FsK της μεταλλαγμένης σειράς.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η βιολογική καταπολέμηση αποτελεί σήμερα ένα από τα κύρια αντικείμενα επιστημονικών ερευνών στον τομέα της καταπολέμησης των ασθενειών. Σε ολόκληρο τον κόσμο γίνονται πειράματα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Αυτό μας δίνει ελπίδες ότι η βιολογική καταπολέμηση δεν θα είναι στο μέλλον κάτι το ακατόρθωτο και ότι σύντομα θα μπορεί να εξελιχθεί σε έναν εναλλακτικό και οικονομικό τρόπο καταπολέμησης των ασθενειών και δεν θα επιβαρύνουμε πλέον το περιβάλλον με φυτοφάρμακα.

Η χρησιμοποίηση μη παθογόνων μικροοργανισμών για τον έλεγχο μυκητολογικών ασθενειών άρχισε περίπου στις αρχές του 20ου αιώνα. Το 1921 ο Hartley χρησιμοποίησε ανταγωνιστές μύκητες για να καταπολεμήσει σήψεις σε σπορόφυτα κωνοφόρων. Το 1927 οι Millard και Teylor πειραματίστηκαν στην ασθένεια που προκαλείται από το παθογόνο *Streptomyces scabies* και απέδειξαν ότι η καταπολέμησή της συνδεόταν με τη δράση ανταγωνιστών μικροοργανισμών, και πιο συγκεκριμένα βακτηρίων που προήλθαν από χλωρή λίπανση. Το 1951 ο Wood εμβολίασε γερασμένα φύλλα μαρουλιού με ανταγωνιστές (*Fusarium* sp. *Penicillium claviforme*), για να εμποδίσει την αρχική εγκατάσταση του *B.cineria* (Dubos 1992).

Με τον καιρό όλο και περισσότερο αύξανε ο αριθμός των δημοσιεύσεων που ανέφεραν την καταπολέμηση ασθενειών με ανταγωνιστές μικροοργανισμούς. Πολύ λίγες, όμως, είναι οι περιπτώσεις που οι ανταγωνιστές μπορούν να εφαρμοστούν σε εμπορικό επίπεδο. Ως παράδειγμα αναφέρεται το *Trichodex*, ένα σκεύασμα του μύκητα *Trichoderma harzianum*, που παράγεται σε εμπορική κλίμακα από το 1985 από την εταιρεία Makteshim και βρέθηκε αποτελεσματικό για την καταπολέμηση της τεφρής σήψης. Ένα άλλο βιομυκητοκτόνο, που ονομάστηκε *Mycostop* και βασίστηκε στο μύκητα *Streptomyces griseovirides*, θα εγκριθεί για τον έλεγχο του μύκητα *B. cinerea* στο μαρούλι στη Φιλανδία, μετά τις τοξικολογικές δοκιμές (Dubos 1992). Στην πράξη χρησιμοποιούνται σκευάσματα με βάση τους μύκητες

Trichoderma spp. T.harzianum, T.viride, όπως τα Trichotec, Trichodex-T39, Fior κλπ.

Μερικά από τα σκευάσματα αυτά περιέχουν στελέχη ανθεκτικά ή ανεκτικά σε μυκητοκτόνα, που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της τεφρής σήψης (benomyl, PCAF). Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει τη συνεφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος με ένα από τα μυκητοκτόνα αυτά (Μπούρμπος και Σκουντρινιδάκης 1993). Ο πιο αποδεκτός ορισμός για τη βιολογική καταπολέμηση είναι αυτός που δόθηκε από τους Cook και Baker (1983) και αναφέρει τα εξής: “Βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων των φυτών είναι η μείωση της ποσότητας του μολύσματος ή της νοσογόνου δράσης τους, που πραγματοποιείται από ή διαμέσου ενός ή περισσότερων οργανισμών, άλλων από τον άνθρωπο”.

Η τοματοκαλλιέργεια είναι η σημαντικότερη λαχανοκομική καλλιέργεια στην Ελλάδα και τα επεξεργασμένα προϊόντα της κατέχουν την πρώτη θέση στις εξαγωγές λαχανοκομικών προϊόντων (Ντόγρας Κ. 1991). Η Ελλάδα μάλιστα συγκαταλέγεται στις χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομηχανικής τομάτας. Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η β. τομάτα αποτελεί σημαντική πηγή εισοδήματος για τον αγροτικό κόσμο της Ελλάδας.

Η τομάτα είναι ένα προϊόν που απαιτεί πολλούς ψεκασμούς για ασθένειες στα πλαίσια της χημικής γεωργίας. Κατέχει μάλιστα την πρώτη θέση στη λίστα επικινδυνότητας εκδήλωσης ογκογένεσης στον άνθρωπο λόγω διατροφής (Μπούρμπος, 1996). Η αλόγιστη χρήση χημικών φαρμάκων στη γεωργία οδηγεί παραγωγούς και καταναλωτές με όλο και πιο γρήγορο ρυθμό στη βιολογική γεωργία.

Όπως γίνεται κατανοητό η καλλιέργεια της βιομηχανικής τομάτας στην Ελλάδα με βάση τους κανόνες της βιολογικής γεωργίας βρίσκει πρόσφορο έδαφος. Απομένει να απαντηθούν δύο βασικά ερωτήματα: α) αν είναι εφικτή η καλλιέργεια της με βάση τους κανόνες της βιολογικής γεωργίας και β) αν είναι συμφέρον για τον παραγωγό αλλά και την ελληνική οικονομία το οικονομικό αποτέλεσμα που θα προκύψει.

ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Όπως τα ζώα, τα φυτά έχουν επίσης να αντιμετωπίσουν μια ευρεία ποικιλία εχθρών, οι οποίοι περιλαμβάνουν έντομα, νηματώδεις, παθογόνους μύκητες, βακτήρια, ιούς και πολλούς άλλους οργανισμούς. Το αμυντικό σύστημα των φυτών μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες με βάση την απόκριση της άμυνας: παθητική, εάν είναι μια προϋπάρχουσα ανταπόκριση του φυτού ενάντια στα παθογόνα και εχθρούς και της ενεργού ή επαγώμενης εάν η ανταπόκριση αναπτύσσεται μετά τη μόλυνση ή επίθεση από το παθογόνο.

Παθητική Άμυνα:

Αυτό το είδος της απάντησης της άμυνας οφείλεται στην παρουσία ορισμένων ανατομικών ή μορφολογικών στοιχείων ή στη παρουσία των μεταβολιτών που υπάρχουν στο σώμα του φυτού. Η εξωτερική κάλυψη της επιφάνειας των φυτών μπορεί να είναι ειδικού τύπου, όπως η επιδερμίδα ή το κερί, στον οποίο δεν μπορεί να επιτεθεί ο κάθε μικροοργανισμός ή να αφομοιωθεί από τον μύκητα μόλυνσης ή τα βακτήρια. Η παρουσία ισχυρών υλικών όπως λιγνίνη, σκληρός φλοιός, νευρώσεις των φύλλων, επιφανειακά τριχίδια κ.λπ. μπορεί να εμποδίσει αποτελεσματικά τη διείσδυση οργανισμών από την επιφάνεια των φυτών. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών όπως αλκαλοειδή, τανίνες, φαινόλες, ρητίνες, κλπ, τα οποία είναι τοξικά για τα παράσιτα και παθογόνους παράγοντες. Ορισμένες από τις ενώσεις αυτές μπορούν να έχουν αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές, ή εντομοκτόνες ιδιότητες. Εκτός από την ύπαρξη δευτερογενών μεταβολιτών, υπάρχουν ορισμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια, τα οποία έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Για παράδειγμα, υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία μπορούν και προκαλούν λύση των βακτηρίων και μυκήτων.

Ενεργή Άμυνα:

Η παρουσία της άμυνας, η οποία επάγεται μετά από προσβολή από εχθρό και δεν είναι παρούσα στο παρελθόν στο κύτταρο ή στον οργανισμό, ονομάζεται ενεργή άμυνα. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα μέρος του φυτού στο οποίο μπορεί να παρουσιαστεί αλλαγή στη δομή του ως αποτέλεσμα της άμυνας του φυτού έναντι κάποιου μικροοργανισμού. Όταν ένας μικροοργανισμός όπως ένας μύκητας ή ένα βακτήριο ξεκινά μολύνοντας το σώμα των φυτών από την επιφάνεια, το κυτταρικό τοίχωμα στο σημείο διείσδυσης αυξάνεται σε πάχος, ούτως ώστε η διείσδυση να είναι αδύνατη. Η αλλαγή στο πάχος οφείλεται στην προσθήκη νέων υλικών κυρίως στην περιοχή της λοίμωξης. Ένας άλλος ενδιαφέρων μηχανισμός απόκρισης σε προσβολή από παθογόνα καλείται αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response- HR). Η αντίδραση υπερευαισθησίας διεγείρεται από το παθογόνο ή από τα προϊόντα του μεταβολισμού τους και προϋποθέτει μοριακή επικοινωνία αλληλοαναγνώρισεως ξενιστή και παθογόνου. Αφορά ασύμβατες σχέσεις παθογόνου-ξενιστή και περιλαμβάνει κυτταρολογικές και βιοχημικές αλλοιώσεις και ταχύτατη νέκρωση των προσβαλλόμενων κυττάρων με επακόλουθο τον εγκλωβισμό του παθογόνου στην αρχική θέση διεισδύσεως του. Το σύστημα των φυτών ή τα κύτταρα γύρω από την περιοχή της λοίμωξης παράγουν επίσης ορισμένα νέα χημικά προϊόντα για την αντιμετώπιση της λοίμωξης που είναι γνωστά ως φυτοαλεξίνες. Είναι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις που παράγονται όταν υπάρχει μικροβιακή επίθεση ή υπό συνθήκες πίεσης, τα οποία είναι εντελώς απόντα σε υγιείς ιστούς.

Μία άλλη μορφή «ανοσοποίησης», η οποία προκαλείται από βιολογικούς παράγοντες είναι η επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή. Ορίζεται ως η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα. Η μορφή αυτής της προστασίας διαχωρίζεται σε **επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα** (Systemic Acquired Resistance-SAR), όταν ενεργοποιείται κατόπιν μολύνσεως του ξενιστή με ένα παθογόνο και σε **επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα** (Induced Systemic Resistance-ISR), όταν επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση, π.χ. ριζοβακτήρια. Επιπλέον, η ανοσοποίηση εμφανίζεται με δύο μορφές: μία τοπικού και μία διασυστηματικού χαρακτήρα.

Επαγόμενη διασυστηματική Ανθεκτικότητα:

Η ευαισθησία, ανεκτικότητα ή ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα συνιστά μια μάλλον εξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητολογικών και αντιβακτηριολογικών πρωτεϊνών ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν το αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση. Η παρουσία θρεπτικών και η απουσία τοξικών ουσιών στο σημείο προσβολής είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας. Η Επαγόμενη Ανθεκτικότητα είναι ένας νέος σχετικά και σημαντικός μηχανισμός άμυνας των φυτών. Ορίζεται ως αυξημένη ανθεκτικότητα σαν αποτέλεσμα της επίδρασης εξωγενών παραγόντων χωρίς αλλαγή του γονιδιώματος. Μη παθογόνες φυλές μικροοργανισμών ή ουσίες όπως το σαλικυλικό οξύ μπορούν να προκαλέσουν Επαγόμενη Ανθεκτικότητα. Φυτά τομάτας στα οποία εφαρμόστηκε ο *Bacillus subtilis* στο ριζικό σύστημα είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθεί έως 50% ο παρασιτισμός από τον *Phytophthora infestans* (Kilian *et al* 2000) ενώ σε φυτά φασολιού στα οποία έγινε εφαρμογή του *Pseudomonas aeruginosa* μέσω του σαλικυλικού οξέος επιτεύχθηκε ανθεκτικότητα κατά του *Botrytis cinerea* (Meyer and Hofte 1997). Οι Raupach and Kloepper (1998), μελέτησαν ένα μείγμα από plant growth-promoting rhizobacteria (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*) για την αποτελεσματικότητά τους ενάντια σε παθογόνα φυλλώματος στο αγγούρι. Μέσω της επαγόμενης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (ΕΣΑ-induced systemic resistance) παρατηρήθηκε καταστολή της γωνιώδους κηλίδωσης (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) και της ανθράκωσης (*Colletotrichum orbiculare*). Plant growth-promoting rhizobacteria οδήγησαν άμεσα ή έμμεσα σε επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα φυτών αγγουριού κατά του *Erwinia tracheiphila* και φυτών τομάτας κατά των cucumber mosaic virus (CMV) και tomato mottle virus (ToMoV) (Zehnder *et al* 2001). Ομοίως θετικά αποτελέσματα κατά της ανθράκωσης, της γωνιώδους κηλίδωσης και της μάρανσης από *Fusarium* στο αγγούρι παρατήρησε οι Koike *et al* (2001) ύστερα από εφαρμογή plant growth promoting fungi. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ΕΣΑ δεν είναι απολύτως ξεκάθαροι όμως το πιθανότερο είναι να παράγονται αντιμικροβιακοί παράγοντες όπως οι φυτοαλεξίνες. Φαίνεται να έχει άμεση σχέση με το σαλικυλικό οξύ (De Meyer and Hofte 1997), με την αυξημένη

δράση χιτινάσης και περοξειδάσης (Nandakumar *et al* 2001), την εναπόθεση λιγνίνης (Koike *et al*, 2001) κ.α.

Έχουν διενεργηθεί πολλές μελέτες για τον έλεγχο της άμυνας των φυτών έναντι διαφόρων μυκήτων. Έχει επίσης αποδειχτεί πως σε μόλυνση φυτών από παθογόνα, όπως τα *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*, στο μηχανισμό άμυνας των φυτών υπάρχει συμμετοχή του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA) και του αιθυλενίου (ET), καθώς και των μονοπατιών πρόσληψης και μεταγωγής του σήματός τους στα φυτά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το αιθυλένιο και το μονοπάτι μεταγωγής του σήματός του συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών ενάντια σε διάφορα παθογόνα και ιδιαίτερα τα νεκροτροφικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι η μη αντίληψη του αιθυλενίου προάγει την ασθένεια που προκαλούν τα παθογόνα ενώ σε άλλες φάνηκε ότι τα φυτά δεν παρουσίασαν τόσο έντονα συμπτώματα όσο τα φυτά αγρίου τύπου. Πάντως, σε καμία περίπτωση τα μειωμένα συμπτώματα δεν συσχετίστηκαν με τη μειωμένη ποσότητα των παθογόνων στους ιστούς των φυτών, υποδεικνύοντας ότι η μη αντίληψη του αιθυλενίου δεν ενεργοποιεί την καταστολή της ανάπτυξης των παθογόνων αλλά είναι μια αντίδραση που σχετίζεται κυρίως με τη φυσιολογία των φυτών.

ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες είναι γενικώς ετερότροφοι, μικροσκοπικοί μικροοργανισμοί, που δε διαθέτουν χλωροφύλλη. Στερούνται αμύλου αλλά συνθέτουν γλυκογόνο. Συνήθως σχηματίζουν νηματοειδείς διακλαδιζόμενες υφές, που ονομάζονται μυκήλια, διαθέτουν οργανωμένους πυρήνες και παράγουν διαφόρων ειδών σπόρια. Όλοι οι μύκητες δεν προκαλούν ασθένειες στα φυτά. Πράγματι, υπάρχουν πάνω από 70.000 είδη μυκήτων που ζουν ως σαπρόφυτα σε νεκρά οργανικά υποστρώματα και συμβάλουν στην αποδόμησή τους.

Οι μύκητες θα μπορούσαν αρχικά να διακριθούν σε παθογόνους και σε μη παθογόνους. Η πρωταρχική διάκριση μεταξύ των παθογόνων μυκήτων αφορά στην εξειδίκευσή τους να επιβιώνουν επιλεκτικά στο έδαφος ή σε φυτικά υπολείμματα, σε υπόγεια ή εναέρια τμήματα του ξενιστή και να προσβάλλουν αντιστοίχως, υπέργεια ή υπόγεια όργανα του φυτού. Επιπλέον, οι μύκητες μπορούν να είναι μονοκύτταροι, όπως οι ζύμες, ή πολυκύτταροι οργανισμοί.

2.1.1 ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες αυτοί αποτελούν τη σπουδαιότερη και μεγαλύτερη ομάδα παθογόνων μικροοργανισμών των φυτών καθώς προκαλούν το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενειών και τη μεγαλύτερη οικονομική ζημιά. Έχουν υπολογιστεί περίπου 6.500 είδη μυκήτων που αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα των ανώτερων φυτών.

2.2 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες έχουν μια ποικιλία απαιτήσεων για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Ακόμη και αν το έδαφος είναι ολιγοτροφικό, μέχρι και 10⁶ μυκήτων ανά g μπορεί να απομονωθεί από το έδαφος. Ακόμη και υψηλότερη πυκνότητα μπορεί να

βρεθεί σε υποστρώματα πλούσια σε οργανική ουσία, ενώ σημαντικό ρόλο για τον πληθυσμό τους παίζει και το pH, ο αερισμός, η θερμοκρασία και η υγρασία του εδάφους. Επιπλέον, οι μύκητες χρειάζονται οργανική ουσία για να επιβιώσουν, καθώς και να καταλαμβάνουν χώρο, ώστε να μπορούν να αυξήσουν την πρόσβασή τους για την αναζήτηση τροφής. Ωστόσο, παρά τις διαφορετικές τάξεις που μπορεί να συνυπάρχουν στο έδαφος, οι μύκητες μπορεί να αλληλεπιδρούν χωρίς όμως απαραίτητα να ανταγωνίζονται, αν διαφέρουν οι διατροφικές τους ανάγκες. Ένας από τους οργανισμούς μπορεί να είναι η πηγή τροφής για τους άλλους, ή μπορεί να μοιράζεται πόρους με κάποιο τρόπο. Οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να υπάρξουν μεταξύ των μυκήτων μπορούν να είναι:

Έμμεσες αλληλεπιδράσεις: παρατηρούνται όταν η φυσιολογική δράση και συμπεριφορά ενός μύκητα μεταβάλλεται από τη παρουσία άλλων παθογόνων. Για παράδειγμα, ένας μύκητας μπορεί να αφαιρέσει όλα τα θρεπτικά συστατικά από τη ζώνη μεταξύ των δύο μυκήτων εμποδίζοντας έτσι στον άλλο την πρόσβαση σε αυτά. Η έμμεση αλληλεπίδραση είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν ένας πόρος βρίσκεται σε έλλειψη ή πολύ μικρές συγκεντρώσεις, και ένας από τους ανταγωνιστές έχει μια υψηλή ανάγκη για τον πόρο αυτό. Σε περίπτωση που ο πόρος είναι άφθονος, τότε θα περιμέναμε να δούμε την ανάπτυξη υφών και των δύο μυκήτων χωρίς εμφανή αλληλεπίδραση. **Άμεσες αλληλεπιδράσεις:** μπορεί να πραγματοποιηθούν στην απουσία οποιασδήποτε επαφής μεταξύ των ανταγωνιστών. Πολλοί μύκητες παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που είτε αναστέλλουν ή σκοτώνουν τους μύκητες ανταγωνιστικά, σε κάποια απόσταση. Η παραγωγή των αναστολέων είναι ευρέως διαδεδομένη στους μύκητες.

2.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ωφέλιμων μικροοργανισμών των φυτών στις τάξεις των οποίων υπάρχουν και βακτήρια. Αποστολή τους είναι η προστασία του ριζικού συστήματος των φυτών από επίδοξους εισβολείς. Προστατεύουν από φυτοπαθογόνους μύκητες και φυτοπαθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν το ριζικό σύστημα, και επίσης μέσα από αδιευκρίνιστους έως σήμερα μηχανισμούς έχει βρεθεί να προστατεύουν από μύκητες βακτήρια και ιούς που προσβάλλουν το υπέργειο μέρος των φυτών (βλέπε επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα). *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Coniothyrium*, *Verticillium*, *Bacillus*,

Streptomyces, *Gliocladium*, *Pythium*, *Talaromyces*, είναι μερικά από τα σημαντικότερα γένη που μας έχουν δώσει εξαιρετικής σπουδαιότητας μικρόβια στην αντιμετώπιση των ασθενειών του ριζικού συστήματος. Επίσης μη παθογόνες φυλές *Rhizoctonia*, μη παθογόνες φυλές *Fusarium*, μη παθογόνες φυλές *Pseudomonas solanacearum*, και *Phlebia gigantea* είναι μερικοί από τους περισσότερους δοκιμασμένους μικροοργανισμούς. Δυστυχώς και εδώ οι κακές συνθήκες στράγγισης και αερισμού, η έλλειψη οργανικής ουσίας και η αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων είναι οι σημαντικότερες αιτίες που οδηγούν στο να μειωθεί σημαντικά ο πληθυσμός αυτών των εξαιρετικά ωφέλιμων βακτηρίων και μυκήτων.

2.3.1 *Trichoderma* sp.

Τα διάφορα είδη μυκήτων *Trichoderma* βρίσκονται συνήθως σε όλα τα εδάφη, και επιπλέον είναι οι πιο επικρατούντες μύκητες που μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Πολλά είδη σε αυτό το γένος μπορούν να χαρακτηριστούν ως μη υποχρεωτικοί και μη παθογόνοι συμβιώτες. Οι καλλιέργειες τους είναι χαρακτηριστικά ταχέως αναπτυσσόμενες στους 25-30°C. Διάφορα είδη *Trichoderma* έχουν μελετηθεί για να αποδειχθεί τελικά πως είναι ανταγωνιστικοί μύκητες ενάντια σε άλλους παθογόνους μύκητες. Μάλιστα πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η δράση κατά των παθογόνων μυκήτων μπορεί να εμπλέκει έμμεσους μηχανισμούς που ομοιάζουν στην επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα και την επαγόμενη από ριζοβακτήρια διασυστηματική ανοχή. Οι περισσότεροι ανταγωνιστικοί μύκητες είναι από τα είδη *T.harzianum* και *T. hamatum*.

2.3.2 Στελέχη *Fusarium oxysporum*

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* έχει μελετηθεί αρκετά, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί ασθένειες σε σημαντικά από οικονομικής πλευράς φυτικά είδη.

Ο μύκητας *F. oxysporum* ανήκει στην οικογένεια Tuberculariaceae της τάξης Moniliales των Ατελών Μυκήτων. Σχηματίζει δύο ειδών κονίδια: τα μακροκονίδια και τα μικροκονίδια καθώς και τα ανθεκτικά στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες χλαμυδοσπόρια. Ο μύκητας παρουσιάζει μεγάλη μορφολογική και φυσιολογική παραλλακτικότητα, με αποτέλεσμα παλαιότερα να ταξινομούνταν σε πολλά διαφορετικά είδη. Αργότερα, όμως, οι Snyder & Hansen ενοποίησαν όλα αυτά τα

είδη στο είδος *F. oxysporum*, στο οποίο έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα περισσότερες από 120 ειδικές μορφές και φυλές καθώς επίσης πολυάριθμα μη-παθογόνα στελέχη. Λόγω της μεγάλης εξάπλωσης των τελευταίων είναι δυνατόν να οδηγηθούμε στη λογική υπόθεση της καταγωγής των παθογόνων από μη-παθογόνους προγόνους (Gordon T. R., Martyn R. D. 1997).

Έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium oxysporum* Fo 47 ενάντια σε ασθένειες που προκαλούνται από φουζάρια και αποδίδεται κυρίως στον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία αλλά και σε μικρότερη έκταση στη διέγερση ενός μηχανισμού διασυστηματικής προστασίας που παραπέμπει στο μηχανισμό SAR και επιπλέον εμπλέκει τη σύνθεση PR πρωτεϊνών (Fuchs *et al.* 1997, Duijff *et al.* 1998).

Έτσι σύμφωνα με πειράματα ο εμβολιασμός ριζών φασολιών με το στέλεχος αυτό περιόρισε την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, στην επιδερμίδα και τον εξωτερικό φλοιό της ρίζας (Benhamou και Garand, 2001).

2.3.3 *Fusarium solani* K

Το 2005, οι Kavroulakis *et al.*, παρατήρησαν την ικανότητα ενός compost, προϊόν θερμόφιλης βιοαποικοδόμησης στέμφυλων οινοποιίας και στερεών αποβλήτων ελαιουργίας, να περιορίζει την εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis – lycopersici* στις ρίζες φυτών τομάτας σε σχέση με φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα τύρφης. Δύο χρόνια αργότερα, το 2007, οι ίδιοι ερευνητές, με ημιεκλεκτικά υποστρώματα, απομόνωσαν ένα στέλεχος του γένους *Fusarium* από ρίζες φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί στο ίδιο κομποστοποιημένο υλικό αναμεμιγμένο με τύρφη. Το στέλεχος αυτό που αναφέρεται ως *Fusarium solani* K (Fs-K) ήταν ικανό να επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) ενάντια στον παθογόνο μύκητα *Septoria lycopersici* που προσβάλλει τα φύλλα της τομάτας και να δρα ανταγωνιστικά ως προς τον παθογόνο μύκητα του εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis – lycopersici* (FORL).

Σε προηγούμενη μελέτη, απεδείχθει πως ο μύκητας Fs-K αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο είναι ικανό να ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL διεκδικώντας το ίδιο διαθέσιμο υπόστρωμα. Έτσι πάλι να ασκεί επίδραση στη βιωσιμότητα του παθογόνου

και την ικανότητα βλάστησης των σπορίων του εξαιτίας της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων.

Ο μύκητας Fs-K είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσει άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μελέτης που έχει πραγματοποιηθεί (Kavroulakis *et al*, 2007) , στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες σειρές τομάτας ως προς τη σύνθεση του αιθυλενίου και του γιασμονικού οξέως, το μονοπάτι μετάδοσης σήματος που ρυθμίζεται από το αιθυλένιο είναι απαραίτητο στην εκδήλωση της προστατευτικής δράσης του Fs-K, ενώ για το γιασμονικό οξύ δε φάνηκε να παίζει ουσιαστικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό.

ΜΕΡΟΣ 3^ο

Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ

Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici

Το Γένος *Fusarium* θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων διότι προκαλεί σοβαρές καταστρεπτικές ασθένειες, όπως αδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσεως και του στελέχους, τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων όπως στα σιτηρά. Γενικά το γένος *Fusarium*, προκαλεί σήψεις φλοιού, ριζών, καρπών, ακραίο μαρασμό, κηλίδωση φύλλων, καθοδική νέκρωση, έλκος και αδρομύκωση. Το πιο σημαντικό ίσως από αυτά τα συμπτώματα της ασθένειας είναι η αδρομύκωση, η οποία και προκαλείται από τις φυλές του *Fusarium oxysporum*. Η μελέτη που εκπονήθηκε αφορά τον ατελή μύκητα *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. *F.sp. radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker (FORL) που προκαλεί την ασθένεια της σήψης του λαιμού και των ριζών (crown and root rot) η οποία παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Στη χώρα μας παρατηρήθηκε στην Κρήτη κατά τη καλλιεργητική περίοδο 1981-82 και έκτοτε προκαλεί κάθε χρόνο σοβαρές ζημιές στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Έχει αποδειχθεί πως το φάσμα ξενιστών του FORL περιλαμβάνει εκτός από τη τομάτα και άλλα είδη όπως *Vicia faba* L., *Trifolium repens* L., *Phaseolus vulgaris* L. (Menzies et al. 1990)



Εικόνα 1: Συμπτώματα του FORL στο λαιμό φυτού τομάτας ποικιλίας sitiens

Το στέλεχος *FORL* αναπτύσσεται καλύτερα στους 18°C και ευδοκιμεί σε μεγάλη ποικιλία τιμών pH, καθώς έχει εντοπιστεί σε πολλούς διαφορετικούς τύπους εδαφών. Οι επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες τομάτας στο ίδιο έδαφος είναι επίσης ένας παράγοντας που ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου. Ιδιαίτερα σε εδάφη που έχουν υποστεί απολυμάνσεις η διάδοση της ασθένειας μπορεί να γίνει ταχύτατα αφού απουσιάζει το φαινόμενο του βιολογικού ελέγχου. Μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό ή νερό άρδευσης μπορούν να συνεισφέρουν στην εξάπλωση της ασθένειας. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα εξάπλωσής του μέσω του αέρα, με μεταφορά κονιδίων.

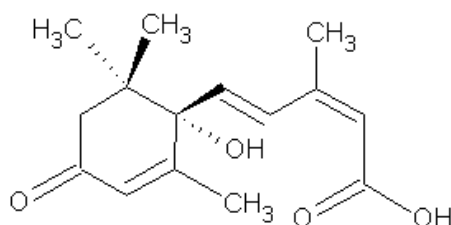
Προσφάτως έγινε μια μελέτη της αλληλεπίδρασης βιολογικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* στην τομάτα όπου σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του υπερπαράσιτου μύκητα *Clonostachys rosea* IK726 και του βακτηρίου *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 στην αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis – lycopersici* που προκαλεί σήψη στο λαιμό και τις ρίζες φυτών τομάτας (Τσελέπης, 2008). Τα αποτελέσματα στα *in vitro* πειράματα έδειξαν πως συγκεκριμένος μεταβολίτης αναστέλλει την ανάπτυξη τόσο του φυτοπαθογόνου όσο και του υπερπαράσιτου μύκητα. και παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση των δύο βιολογικών παραγόντων αφού η συνδυασμένη εφαρμογή αυτών μείωσε σημαντικά το δείκτη ασθένειας των φυτών τομάτας συγκρινόμενα με τα φυτά του θετικού μάρτυρα αλλά και των φυτών όπου οι βιολογικοί παράγοντες εφαρμόστηκαν ξεχωριστά. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των *in planta* πειραμάτων σε τύρφη, η ταυτόχρονη εφαρμογή των δύο βιολογικών παραγόντων μείωσε σημαντικά το δείκτη ασθένειας των φυτών, σε σύγκριση με τα φυτά του θετικού μάρτυρα αλλά όχι και των φυτών όπου οι βιολογικοί παράγοντες εφαρμόστηκαν ξεχωριστά.

ΜΕΡΟΣ 4^ο

ΤΟ ΑΜΠΣΙΣΙΚΟ ΟΞΥ

4.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

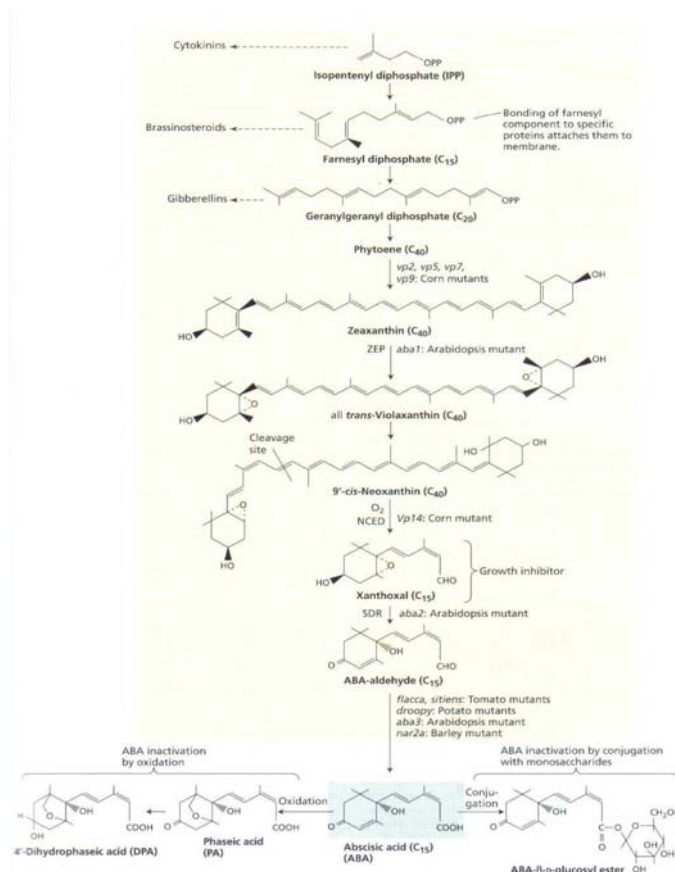
Το αμπισικό οξύ (Absciscic acid, ABA) ανήκει στην λίστα με τις πέντε γνωστές φυτικές ορμόνες. Ανήκει στην ομάδα των τερπενίων καθ'ότι είναι ένα σεσκιτερπενοειδές, το οποίο αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα.



Εικόνα 2 : Η δομή του αμπισικού οξέος

Έχει την ικανότητα να συντίθεται σε κάθε φυτικό κύτταρο το οποίο διαθέτει πλαστίδια, και να μεταφέρεται τόσο μέσω του ηθμού αλλά και του ξύλου.

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης του αμπισικού οξέος θεωρείται ότι περιλαμβάνει τρία στάδια εκ των οποίων τα δύο πρώτα εκτυλίσσονται αποκλειστικά στους χλωροπλάστες, ενώ οι τελικές καθοριστικές αντιδράσεις σύνθεσης εντοπίζονται στο κυτόπλασμα. Πρόσφατα πειράματα υποστηρίζουν πως το μονοπάτι της βιοσύνθεσης αναπαριστάται από την παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3: Μονοπάτι βιοσύνθεσης αμπισισικού οξέος.

- Κατά της πρώιμες αντιδράσεις (I), μέσω της μεταβολικής οδού του μεβαλονικού και τη βιοσυνθετική οδό του πυροσταφυλικού συσσωρεύονται ενδιάμεσες φωσφορυλιωμένες ενώσεις που αποτελούν τα πρόδρομα μόρια των ενδιάμεσων αντιδράσεων (II). Συγκεκριμένα, το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), αποτελούν τις ενεργοποιημένες πρόδρομες μορφές μορίων οι οποίες συνδυαζόμενες παράγουν τα διάφορα μόρια των τερπενίων.
- Οι ενδιάμεσες αντιδράσεις ξεκινούν με τη διάσπαση του β-καροτενίου (τετρατερπένιο με 40 άτομα άνθρακα) προς παραγωγή της ζεαξανθίνης και μια σειρά από εποξειδώσεις και ισομεριώσεις τερματίζονται από τη διάσπαση της 9'-cis-νεοξανθίνης προς ξανθοξάλη που αποτελεί και το σκελετικό μόριο (C₄₀) του αμπισισικού οξέος.
- Το τελικό στάδιο (III) δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένο, ωστόσο υποστηρίζεται ότι η ξανθοξίνη μετατρέπεται σε αλδεύδη του αμπισισικού

οξέος με τη δράση της πρωτεΐνης ABA2/SDR (short-chain alcohol dehydrogenase/reductase, SDR) και με τη βοήθεια της οξειδάσης της αλδεϋδης του αμπισισικού οξέος παράγεται το αμπισισικό οξύ.

Αρκετά ABA μεταλλάγματα ταυτοποιήθηκαν, ελλειματικά σε συγκεκριμένα στάδια της βιοσυνθετικής οδού, τα οποία είναι χρήσιμα στην αποκάλυψη των λεπτομερειών της διαδρομής. Επίσης, αυτά τα μεταλλάγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επιδείξουν τις ανωμαλίες που μπορούν ίσως να διορθωθούν από την προσθήκη εξωγενούς αμπισισικού οξέος. Παραδείγματος χάρη, *flacca* (flc) και *sitiens* (sit) "μεταλλάγματα μάρανσης" της ντομάτας, στα οποία η τάση των φύλλων να μαραθούν- που προκαλείται από την ανικανότητα να κλείσουν τα στοματά τους- μπορεί να αποφευχθεί από την προσθήκη εξωγενούς αμπισισικού οξέος. Τα μεταλλάγματα *aba* του φυτού *Arabidopsis* επιδεικνύει επίσης ένα φαινότυπο μαράματος. Τα μεταλλάγματα της σειράς *sitiens* είναι ελλιπή ως προς το δομικό γονίδιο της οξειδάσης της αλδεϋδης του αμπισισικού οξέος, του ενζύμου που όπως αναφέραμε καταλύει τη μετατροπή της αμπισισικής αλδεϋδης σε αμπισισικό οξύ, με αποτέλεσμα τα επίπεδα του ABA των φυτών που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη να ανέρχονται μόλις στο 8% των επιπέδων των φυτών αγρίου τύπου.

4.2 Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΙΣΙΣΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το ABA γενικά διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες των φυτών. Ρυθμίζει διάφορες σημαντικές πτυχές της ανάπτυξης των φυτών με αλληλεπίδραση, συνήθως ανταγωνιστική, με την αυξίνη, τη κυτοκίνη και τη γιββεριλλίνη καθώς επίσης συμμετέχει και σε διάφορες άλλες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως το κλείσιμο των στοματίων, τη διατήρηση της ληθαργικής κατάστασης των σπερμάτων και των οφθαλμών, στη σύνθεση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων αποθήκευσης, τη βλαστικότητα και την άμυνα κατά των παθογόνων. Οι φυσιολογικές δράσεις του ABA μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες και αφορούν

- την έκλυση σταδίων ηρεμίας των φυτικών οργάνων (λήθαργος), και
- την υδατική οικονομία του φυτού

4.2.1. Ρύθμιση της οικονομίας του ύδατος

Ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία έχει το ABA για τη ρύθμιση της οικονομίας του ύδατος, λόγω του κλεισίματος των στομάτων που προκαλεί σε έλλειψη ύδατος. Έτσι σε έλλειψη ύδατος προκαλεί αύξηση της υδραυλικής αγωγιμότητας του ύδατος των ριζών και προαγωγή της αύξησης της ρίζας με ταυτόχρονη αναστολή της αύξησης του βλαστού. Η τελευταία δράση θεωρείται ως μακρόχρονη προσαρμογή σε χρόνια έλλειψη ύδατος. Η αύξηση της υδραυλικής αγωγιμότητας στην περιοχή της ρίζας εμφανίζεται μετά από μερικές ώρες από την έλλειψη ύδατος στο βλαστό.

4.2.2. Προαγωγή του λήθαργου των οφθαλμών και των σπερμάτων

Η συσσώρευση του ABA στα σπέρματα και μεταξύ των άλλων στο σαρκώδες μέρος των καρπών είναι, εξαιτίας της ανασχετικής δράσης στη φύτευση, ένας ουσιώδης παράγοντας για το λήθαργο των σπερμάτων.

Το αμψισικό οξύ προτάθηκε αρχικά ως η επάγουσα για το λήθαργο των οφθαλμών ορμόνη λόγω της συσσώρευσής του στους οφθαλμούς που βρίσκονται σε ληθαργική κατάσταση και της ελάττωσής του μετά την έκθεση του ιστού σε χαμηλές θερμοκρασίες. Πάρα ταύτα, οι τελευταίες μελέτες έδειξαν ότι οι περιεκτικότητες των οφθαλμών σε ABA δε σχετίζεται πάντα με το βαθμό του ληθάργου. Το γεγονός αυτό αντανakλά την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο ABA και τις υπόλοιπες ορμόνες, όπου ο λήθαργος και η αύξηση των οφθαλμών ρυθμίζεται από την ισορροπία ανάμεσα σε αναστολές της αύξησης των οφθαλμών, όπως το ABA, και σε ουσίες που επάγουν την αύξηση, όπως οι κυτοκινίνες και οι γιββεριλλίνες. Έτσι η επαγωγή του λήθαργου των οφθαλμών γίνεται από την υψηλή στάθμη του αμψισικού οξέος και τη χαμηλή στάθμη των κυτοκινινών και των γιββεριλλινών, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση άρσης του ληθάργου. Το έναυσμα για τις μεταβολές στα επίπεδα των ορμονών αυτών δίνεται κυρίως από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως το φως, η υγρασία και η θερμοκρασία.

4.3 Πρόσφατα αποτελέσματα δράσης

Πολλές μελέτες έχουν γίνει τελευταία για τον ρόλο του αμψισικού οξέος, η δράση του οποίου είναι πολλές φορές διφορούμενη. Σύμφωνα με κάποιες νέες μελέτες που

πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε πως η μείωση της αφθονίας των μυκορριζών σε φυτά sitiens συνδέεται άμεσα με την ανεπάρκεια τους στη βιοσύνθεση ABA, και η συσσώρευση του αιθυλενίου, είναι συνέπεια της έλλειψης ABA στις μεταλλάξεις, και πλήττει, κυρίως, το βαθμό αποικισμού της μυκόρριζας (J.A.M. Rodriguez, University of Granada, 2009) . Βάση μίας άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε από τους David De Vleeschauwer *et al*, 2010 στην οποία μελετήθηκε η σχέση του ABA που προστίθεται εξωγενώς με τη δράση του παθογόνου μύκητα *Cochliobolus miyabeanus* στο ρύζι , βρέθηκε πως το ABA ενισχύει την προστασία του φυτού από τον παθογόνο μύκητα. Σύμφωνα, με μία άλλη μελέτη (E. A. Achuo, E. Prinsen and M. Höfte, 2007) που έγινε στα sitiens και RR φυτά τομάτας βρέθηκε πως το εξωγενές ABA είναι ικανό να αυξήσει την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι στον *Botrytis cinerea* καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση της δοθείσας ποσότητας. Βάση δε μιας άλλης μελέτης που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκε πως η εξωγενής προσθήκη αμπισικού οξέος, σε sitiens και RR φυτά, σε συνθήκες ξηρασίας και καλών συνθηκών σε υγρασία, ο αποικισμός των μυκόρριζων μειώνεται σημαντικά (Ricardo Aroca and Maria del Mar Alguacil *et al*, 2008)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε οι μη παθογόνοι μύκητες καθώς και οι παθογόνοι έχουν την ικανότητα να "επικοινωνούν" τόσο μεταξύ τους αλλά και με το φυτό το οποίο έχουν αποικίσει. Πολλές φορές η αλληλεπίδραση του φυτού και του ξενιστή μπορεί να καθοριστεί από ενδογενείς παράγοντες όπως η παρουσία φυτορμονών όπως το αμπισικό οξύ και να καθορίσει το αποτέλεσμα αυτής της συμβίωσης. Για το λόγο αυτό φυτά μεταλλαγμένων σειρών όπως τα sitiens λειτουργούν ως εργαλεία για να απαντηθούν τα ερωτήματα που προκύπτουν για τη δράση τέτοιων ορμονών.

Σκοπός λοιπόν αυτής της εργασίας ήταν να ελεγχθεί εάν τα επίπεδα του αμπισικού οξέος της τομάτας επηρεάζουν το μηχανισμό δράσης του ωφέλιμου μύκητα *Fusarium solani* K ώστε να αντιμετωπίσει τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* και να επιφέρει προστασία στο φυτό. Επιπλέον, μελετήθηκε και κατά πόσο η παρουσία σε δύο διαφορετικά επίπεδα ή η απουσία του αμπισικού οξέος ενισχύει ή όχι την ανάπτυξη των δύο αυτών μυκήτων σε υποστρώματα ανάπτυξης. Τέλος, διερευνήθηκε εάν τα επίπεδα του αμπισικού οξέος επηρεάζουν τον αποικισμό του ωφέλιμου μύκητα στο φυτό. Όλα αυτά τα στοιχεία σε συνδυασμό με άλλα που έχουν ήδη συλλεχθεί ίσως μας δώσουν τη δυνατότητα να κατανοήσουμε τον τρόπο δράσης του FsK με τον οποίο καταφέρνει να αντιμετωπίζει και να αναστέλλει τη δράση ενός τόσο παθογόνου μύκητα όπως αυτός του *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Τα στελέχη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στο παρακάτω πείραμα είναι ο ανταγωνιστικός μύκητας *Fusarium solani* K (Fs-K) και ο παθογόνος μύκητας *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker (στέλεχος CBS 101587, Central Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands). Η απομόνωση του μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K έγινε από κομπόστ προερχόμενο από στέμφυλα οινοποιίας και στερεά απόβλητα ελαιουργίας όπως περιγράφεται από τους Kavroulakis et al. (2007). Τα στελέχη αυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Broth (PDB), στους 25°C, για 5 ημέρες πριν τον εμβολιασμό τους στα φυτά, και υπό συνεχή ανάδευση στις 120 στροφές, στο σκοτάδι.

1.2 ΣΕΙΡΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι σειρές τομάτας (*Lycopersicon esculentum* Mill.) που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του *Fusarium solani* K έναντι του *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* είναι οι εξής: sitiens (μεταλλαγμένη σειρά ως προς τη σύνθεση του αμπισισικού οξέος) και cv. Rheinlands Ruhm (ο αντίστοιχος γενότυπος αγρίου τύπου των sitiens). Τα σπέρματα των προαναφερθέντων σειρών διατέθηκαν από συνάδελφο η οποία και τα συνέλλεξε από φυτά που είχε σε καρποφορία.

Συνολικά έγιναν τέσσερις χειρισμοί για κάθε μία σειρά φυτών τομάτας · 5 γλάστρες με 5 φυτά η κάθε μία που είχαν εμβολιασθεί με *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*, 5 γλάστρες με φυτά που είχαν εμβολιασθεί με *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* και εφαρμόζοντας εξωγενής προσθήκη αμπισισικού οξέος (ABA), 5 γλάστρες με φυτά εμβολιασθέντα με *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* και *Fusarium solani* και 5 γλάστρες με φυτά εμβολιασθέντα με *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* και *Fusarium solani*

και εφαρμόζονταν ταυτόχρονη προσθήκη αμπισισικού οξέος. Τα σπέρματα όλων των σειρών απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 5% (NaOCl) για 10 λεπτά και ακολούθησε καλό ξέπλυμα ώστε να επιτευχθεί πλήρη απομάκρυνση του αρχικού διαλύματος. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία στα οποία και υπήρχαν διηθητικά χαρτιά, τα οποία τέλος τοποθετήθηκαν για προβλάστηση για 2 ημέρες σε ψυγείο με σταθερή θερμοκρασία 25°C. Για κάθε χειρισμό συλλέχθηκαν 25 προβλαστημένα σπέρματα από κάθε σειρά τομάτας και φυτεύθηκαν ανά 5 (5 επαναλήψεις σε κάθε γλάστρα) σε γλάστρες διαμέτρου 30 cm, κάθε μία εκ των οποίων περιείχε περίπου 500cm³ τύρφης εμπλουτισμένη με λίπασμα NPK (20-20-20) τελικής συγκέντρωσης 0.5 g/l, MgSO₄ τελικής συγκέντρωσης 30mg/l, καθώς επίσης και FeSO₄ τελικής συγκέντρωσης 3mg/l. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 20-23°C, σχετική υγρασία 65% και 16 h φωτοπερίοδο. Το πότισμα γινόταν τρεις φορές την εβδομάδα, οι δύο με διάλυμα αμπισισικού οξέος συγκέντρωσης 50μM, το οποίο περιείχε και EtOH 1% στα φυτά που θα εφαρμόζονταν εξωγενής χορήγηση αμπισισικού οξέος και με διάλυμα EtOH 1% στα φυτά που δε θα εφαρμόζονταν καμία χορήγηση αμπισισικού οξέος. Το τρίτο πότισμα που εφαρμόζονταν στο μέσω της εβδομάδας γινόταν με ισορροπημένο θρεπτικό διάλυμα, συμπεριλαμβανομένων και θρεπτικών μικροστοιχείων (Πίνακας 1, Παράρτημα) για την ενίσχυση των φυτών. Το πότισμα με το διάλυμα του ABA και το διάλυμα της αιθανόλης γινόταν σε συγκεκριμένες ποσότητες ανά γλάστρα: 20ml/γλάστρα στο αρχικό στάδιο ανάπτυξής τους και μετά με 40ml/γλάστρα λόγω των αυξημένων αναγκών τους σε υγρασία.



Εικόνα 4: Ανάπτυξη φυτών κατά την 3^η εβδομάδα. Αριστερά sitiens φυτά εμβολιασμένα και με τους 2 μύκητες και εξωγενής προσθήκη αμπισισικού οξέος. Δεξιά φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα και με τους 2 μύκητες και εξωγενής προσθήκη αμπισισικού οξέος.

2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ

Ο εμβολιασμός των φυτών με τον μη παθογόνο μύκητα *Fusarium solani* K πραγματοποιήθηκε την ημέρα της φύτευσης των σπερμάτων, αφού ο μύκητας είχε αναπτυχθεί για 5 ημέρες σε φιάλες με θρεπτικό διάλυμα με PDB, σε επωαστήρα με

σταθερή θερμοκρασία 25°C. Η συγκέντρωση του μολύσματος με τον οποίο εφαρμόστηκε ο εμβολιασμός ήταν 10^5 κονίδια /cm³ υποστρώματος και ο εμβολιασμός και μόλυνση των φυτών διεξήχθη με ριζοπότισμα. Κατόπιν, τα φυτά έμειναν απότιστα για 2 ημέρες. Κατά τη διαδικασία συλλογής των κονιδίων του μολύσματος απομακρύνθηκε το μυκήλιο με χρήση αποστειρωμένου τουλουπάνι και εν συνεχεία ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές, στους 4°C και για 4 λεπτά. Έτσι, συλλέχθηκαν τα κονίδια τα οποία και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl) 0.9%. Η συγκέντρωση των κονιδίων υπολογίστηκε με τη μέθοδο του αιματοκυτόμετρου, και με την κατάλληλη αραίωση επετεύχθη η επιθυμητή συγκέντρωση μολύσματος. Στα φυτά μάρτυρες εφαρμόστηκε ίσος όγκος νερού αντί του μολύσματος.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*, στην ίδια συγκέντρωση, 7 ημέρες μετά τη σπορά και εμβολιασμό με τον *Fs-K*.

Η καταγραφή των αποτελεσμάτων διεξάγονταν κάθε 2 ημέρες με την απαρίθμηση των αποθανόντων φυτών σε αντιδιαστολή με τα υγιή. Η καταγραφή πραγματοποιούνταν στην κάθε μία επέμβαση ανά γενότυπο τομάτας χωριστά. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση παραλλακτικότητας και η στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Tukeys.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *FsK* ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥΣ ΦΥΤΩΝ

3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ

Για τη μελέτη του επιπέδου αποικισμού του *FsK* στους διάφορους γενότυπους χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες σειρές τομάτας, *sitiens* και *RR*. Οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν οι ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η διαφορά με τη προαναφερόμενη όμως διαδικασία είναι πως στη περίπτωση αυτή υπήρξαν δύο διαφορετικοί χειρισμοί με 40 σπέρματα για την κάθε σειρά φυτών: ένας για τη συλλογή των ριζών στις 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, και ο δεύτερος για τη συλλογή των ριζών 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Σε κάθε χειρισμό και για κάθε

σειρά φυτών υπήρξαν 4 επεμβάσεις με 10 σπέρματα η καθεμία· δύο επεμβάσεις με εξωγενής χορήγηση αμπισικικού οξέος εκ των οποίων η μια εμβολιασμένη με τον FsK και άλλες δύο χωρίς καμία χορήγηση αμπισικικού οξέος εκ των οποίων η μία και πάλι εμβολιασμένη με FsK. Οι γλάστρες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη περίπτωση ήταν διαμέτρου 10cm, καθεμία εκ των οποίων περιείχε περίπου 200cm³ τύρφης εμπλουτισμένη με λίπασμα NPK (20-20-20) τελικής συγκέντρωσης 0.5 g/l, MgSO₄ τελικής συγκέντρωσης 30mg/l, καθώς επίσης και FeSO₄ τελικής συγκέντρωσης 3mg/l. Τέλος κάθε γλάστρα χρησιμοποιήθηκε για ένα φυτό. Η ανάπτυξη του μύκητα έγινε στις ίδιες συνθήκες με αυτές παραπάνω, για 5 ημέρες, και ο εμβολιασμός την ημέρα της φύτευσης των σπερμάτων με τον ίδιο τρόπο στην ίδια συγκέντρωση. Για το πάγωμα των ριζών που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο και η αποθήκευσή τους έγινε στους -80°C. Η εξαγωγή του DNA έγινε με το Plant DNA extraction kit Macherey-Nagel.

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο. Από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε 1μl σε σωλήνα erppendorf, όπου και αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:50. Το δείγμα που προκύπτει τοποθετήθηκε σε ειδική κυβέτα και προσδιορίστηκε το φάσμα απορρόφησης από τα 240 έως τα 300nm. Σε υδατικά διαλύματα νουκλεϊνικών οξέων χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια, η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων δίδεται από την εξίσωση:

$$D=0.D_{.260} \times \text{συντελεστής αραιώσης}$$

όπου: 0.D_{.260}, η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm και D η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος που περιέχεται στο δείγμα. Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml. Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός δείγματος των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίστηκε ο λόγος 0.D_{.260} / 0.D_{.280} και 0.D_{.240} / 0.D_{.260}. Για τιμές μεταξύ 1,8-2,0 και 0,5, αντιστοίχως, το δείγμα θεωρήθηκε ικανοποιητικής καθαρότητας.

3.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR (Real Time-PCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού αλληλουχιών DNA. Σε αντίθεση με την κλασσική μέθοδο PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SyberGreen, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλινα μόρια του DNA. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της συσσώρευσης κυττάρων μύκητα σε φυτικά όργανα.

3.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Η επιλογή των εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να απόφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομοδιμερών και ετεροδιμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου. Οι εκκινητές που φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Ορθόδρομου Εκκινητή 5'→3'	Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Οπισθόδρομου Εκκινητή 5'→3'
ITSF	TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	ITSR	GGT ATG TTC ACA GGG TTG ATG
LeUbiF	GCA GAC TAT AAC ATC	LeUbiR	AAC AAC AAA GCA CAC

	CAG AAA GAC		AGC CAT C
--	----------------	--	-----------

3.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ qRT-PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P (ABI). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξη βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στη κάθε αντίδραση. Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξήχθησαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού. Για κάθε χειρισμό πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Livak and Schmittgen, 2001).

4. *In Vitro* ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *FsK* ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *FORL* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

4.1 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥΣ

Τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία διεξήχθη ο *in vitro* έλεγχος της ανάπτυξης των 2 μυκήτων ήταν: 3 φιάλες με θρεπτικό διάλυμα PDB με διαφορετική συγκέντρωση αμπισικικού οξέος και 3 τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA με διαφορετική επίσης συγκέντρωση αμπισικικού οξέος για το κάθε μύκητα. Για κάθε χειρισμό σε θρεπτικό διάλυμα PDB διεξήχθησαν 3 επαναλήψεις και 5 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό στα τρυβλία. Οι συγκεντρώσεις αμπισικικού οξέος που εφαρμόστηκαν ήταν 0μM ABA, 50μM ABA, 100μM ABA με προσθήκη 1% EtOH

σε κάθε έναν χειρισμό. Το αμπισισικό όξυ προστέθηκε στα δύο διαφορετικά υποστρώματα μετά το πέρας της αποστείρωσης και ενώ τα διαλύματα είχαν κρυώσει λόγω της ευαισθησίας του αμπισισικού οξέος σε υψηλές θερμοκρασίας. Έπειτα από καλή ανάδευση τα διαλύματα με PDB εμβολιάστηκαν με τους δύο μύκητες και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 25°C και σε σταθερή ανάδευση για 5 ημέρες όπου και θα μετρηθεί η πυκνότητα των κονιδίων. Τα θρεπτικά διαλύματα με PDA αρχικά ισομοιράστηκαν σε τρυβλία και μετά εμβολιάστηκαν με τους δύο μύκητες. Έπειτα τοποθετήθηκαν στους 25°C και σε σκοτάδι για την ανάπτυξή τους.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

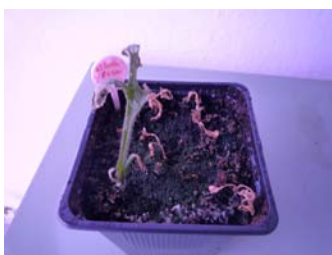
Η μέτρηση της ανάπτυξης των μυκήτων στις φιάλες PDB έγινε με τη μέθοδο του αιματοκυτόμετρου, με την οποία έγινε μέτρηση των κονιδίων του μύκητα στις διάφορες συγκεντρώσεις ABA και κατ'επέκταση της ανάπτυξης των μυκήτων.

Η μέτρηση της ανάπτυξης των μυκήτων στα τρυβλία με PDA πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση του μήκους του μυκηλίου του μύκητα σε διάφορες ημέρες· οι οποίες είχαν προσημειωθεί κατά τη περίοδο ανάπτυξης του κάθε μύκητα.

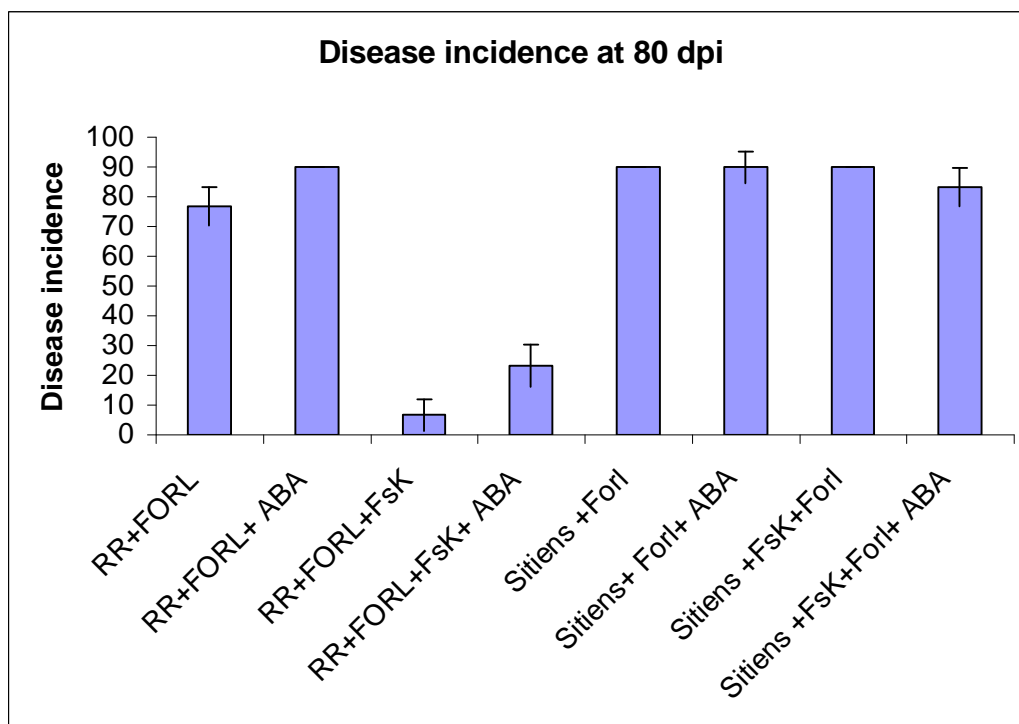
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΣΙΣΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΥ ΕΠΙΦΕΡΕΙ Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *FUSARIUM SOLANI* K .

Στην προσπάθεια να διερευνηθεί η επίδραση που μπορεί να προκαλεί η παρουσία του αμπισιτικού οξέος στον μηχανισμό απόκρισης της τομάτας στην προσβολή του από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* παρουσία του προστατευτικού μύκητα *Fusarium solani* K, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα της σειράς sitiens. Ο εμβολιασμός των φυτών αποκλειστικά με το παθογόνο προκάλεσε τα τυπικά συμπτώματα σήψη λαιμού και ρίζας (Εικόνα 5). Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας παρουσιάστηκαν κατά την 24^η ημέρα μετά τη φύτευσή τους, ενώ μετά από 46 ημέρες προήλθε η καταστροφή όλων σχεδόν των φυτών (Εικόνα 6). Τα φυτά που εμβολιάστηκαν και με τους δύο μύκητες παρουσίασαν τα ίδια συμπτώματα αργότερα (εμφάνιση 1^{ου} θανάτου μετά τις 40 ημέρες) σε πιο ήπια μορφή, ενώ η ολοκληρωτική καταστροφή προήλθε μετά από 80 ημέρες.



Εικόνα 5: Ολοκληρωτικός θάνατος sitiens φυτών εμβολιασμένα με FORL και χωρίς προσθήκη αμπισιτικού οξέος.



Εικόνα 6: Ποσοστό νεκρών φυτών κάθε επέμβασης μέχρι και τις 80 ημέρες. Οι ράβδοι συμβολίζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου των επαναλήψεων.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε η εξωγενής προσθήκη ABA στα sitiens φυτά τα οποία ήταν εμβολιασμένα μόνο με τον μύκητα FORL δε παρουσίασαν καμία αλλαγή στο μηχανισμό δράσης του καθώς τα ποσοστά νεκρών φυτών δε παρουσιάζουν καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Τα αποτελέσματα όμως που παρουσίασαν τα sitiens που είχαν εμβολιαστεί και με τους δύο μύκητες μας δείχνει πως η εξωγενής προσθήκη ABA ενισχύει τη δράση του Fsk. Έτσι φαίνεται πως η προσθήκη του ABA ενισχύει σε την ικανότητα άμυνας των φυτών έναντι του παθογόνου όπως και την ικανότητα προστασίας του Fsk.



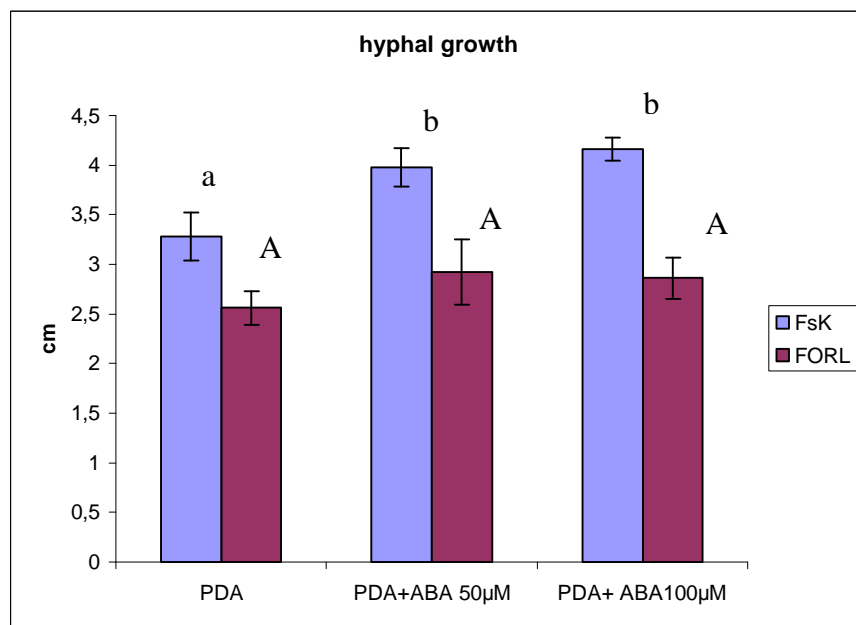
Εικόνα 7: Φυτά σειράς sitiens με εξωγενής προσθήκη ABA, δεξιά εμβολιασμένα και με τον FORL μύκητα, αριστερά και με τους δύο μύκητες.

Στατιστικώς όμως σημαντική είναι και η διαφορά που παρουσιάστηκε μεταξύ των φυτών RR όπου η παρουσία του FsK μείωσε τους θανάτους των φυτών μειώνοντας τη δραστηριότητα του παθογόνου μύκητα και προστατεύοντας τα φυτά.



Εικόνα 8: Ανάπτυξη φυτών· αριστερά sitiens εμβολιασμένο με FORL. Στη μέση sitiens εμβολιασμένα και με τους δύο μύκητες και προσθήκη aba και δεξιά φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα και με τους δύο μύκητες και προσθήκη aba.

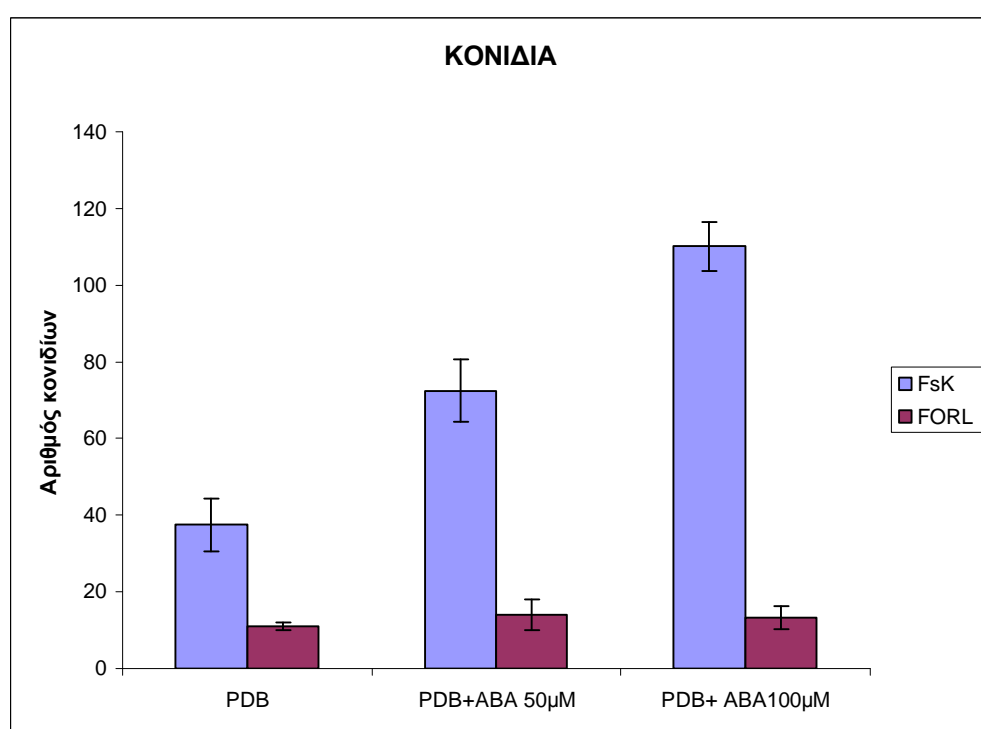
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΙΣΙΣΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ FsK ΚΑΙ ΤΟΥ FORL ΣΕ PDA.



Εικόνα 9: Η ανάπτυξη του FsK και του FORL σε μήκος που έχουν εμβολιαστεί σε τριβλύα με PDA. Τα κοινά γράμματα υποδεικνύουν απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Όπως βλέπουμε στη περίπτωση του FORL δεν έχουμε καμία στατιστική σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη του σε καμία από τις 3 επεμβάσεις. Στη περίπτωση του FsK όμως παρατηρούμε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην παρουσία και απουσία του αμψισικού οξέος καθώς παρουσία του αμψισικού οξέος επέρχεται μεγαλύτερη ανάπτυξη του μύκητα.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΣΙΣΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ FsK ΚΑΙ FORL ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.

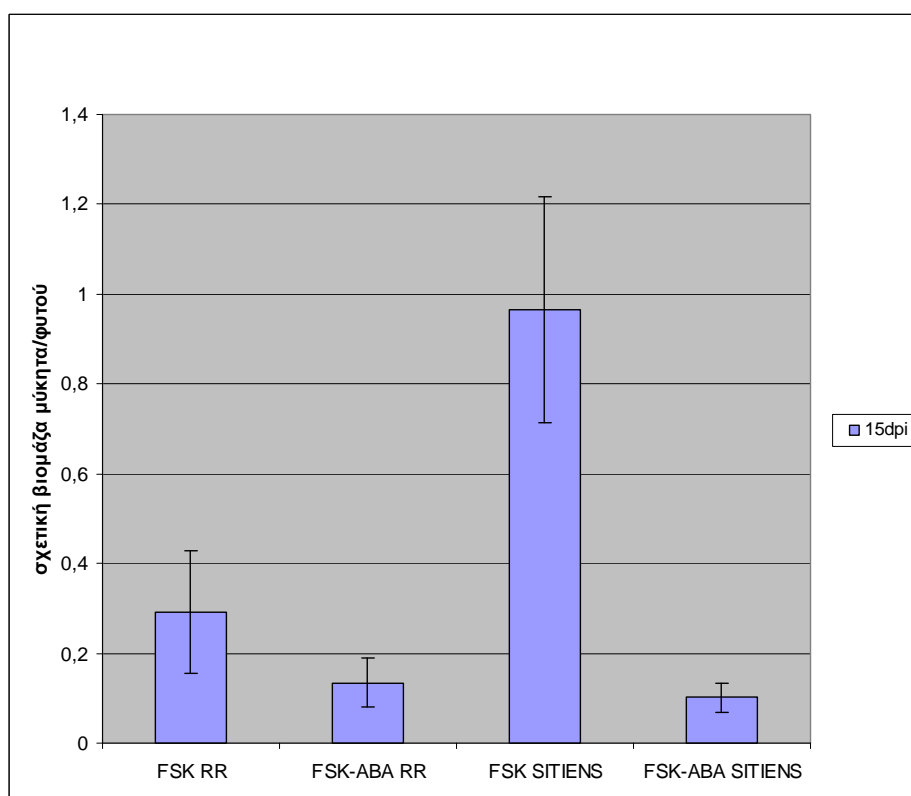


Εικόνα 10: Ανάπτυξη των δύο μυκήτων σε 3 διαφορετικά υποστρώματα. Οι ράβδοι συμβολίζουν την τυπική απόκλιση των μέσων όρων των 5 επαναλήψεων.

Όπως παρατηρούμε υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη του FsK στα 3 διαφορετικά υποστρώματα καθώς προσθήκη ABA ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα, όπως και η υψηλότερη συγκέντρωση των 100μM. Ο FORL αντίθετα δεν έχει καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξή του στα 3 υποστρώματα.

ΒΑΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ FsK ΣΤΑ RR ΚΑΙ SITIENS ΦΥΤΑ ΣΕ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 15 ΗΜΕΡΩΝ.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ικανότητα αποικισμού των ριζών τομάτας από τον μύκητα FsK επηρεάζεται από την παρουσία του αμπισισικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι σειρές RR και sitiens. Η συλλογή των ριζών έγινε 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από τρία φυτά από τα οποία έγινε εξαγωγή γενετικού υλικού. Η σχετική ποσοτικοποίηση των μορίων DNA του φυτού και του μύκητα έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Από τα αποτελέσματα αυτής προκύπτει και το παρακάτω διάγραμμα της Εικόνας 11.



Εικόνα 11: Τα επίπεδα αποικισμού των ριζών του μύκητα FsK στις 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του στις σειρές τομάτας sitiens και Rheinlands Ruhm (RR). Οι ράβδοι συμβολίζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου των 3 επαναλήψεων.

Είναι φανερό πως μεγαλύτερος αποικισμός των ριζών από τον FsK στα *sitiens* έχουμε στην περίπτωση απουσίας του αμψισικού οξέος, καθώς επίσης και στα RR όπου και πάλι έχουμε μεγαλύτερο αποικισμό ριζών από το μύκητα στη περίπτωση απουσίας του αμψισικού οξέος χωρίς όμως να έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Παρατηρούμε επίσης, πως τα επίπεδα αποικισμού στα *sitiens* φυτά στα οποία έγινε προσθήκη ABA εξωγενώς βρίσκονται στο ίδιο σημείο με αυτά των RR.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μη παθογόνος μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K είναι ικανός να ανταγωνιστεί τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* αποικίζοντας το ριζικό σύστημα των φυτών (Kavroulakis *et al*, 2007). Έχει επιπλέον διαπιστωθεί πως ο αποικισμός του FsK μύκητα και ο μηχανισμός δράσης του ελέγχεται από την παρουσία του αιθυλενίου στο φυτό. Συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί πως η παρουσία του αιθυλενίου βελτιώνει την ανταγωνιστική δράση του FsK ενάντια στον παθογόνο FORL, καθώς επίσης και πως η παρουσία του αιθυλενίου ευνοεί τον αποικισμό της ρίζας από τα παθογόνα (Kavroulakis *et al*, 2007). Μέσα από τη μελέτη αυτή λοιπόν, θελήσαμε να δούμε εάν και το αμπισικό οξύ ελέγχει τον αποικισμό του FsK στις ρίζες φυτών τομάτας και κατά πόσο μπορεί να μεταβάλει το μηχανισμό δράσης του ωφέλιμου μύκητα FsK ενάντια στην παθογόνο δράση του FORL. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες σειρές φυτών *sitiens* οι οποίες είναι ελλειπείς ως προς τη βιοσύνθεση αμπισικού οξέος καθώς και αυτές με γενότυπο αγρίου τύπου RR. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αρχική μας υπόθεση ήταν σωστή. Το αμπισικό οξύ επηρεάζει τη ικανότητα αποικισμού του FsK στις ρίζες φυτών τομάτας με αρνητικό τρόπο ενώ σε περιπτώσεις έλλειψης ABA (γενότυπος *sitiens*) ο αποικισμός αυτός αυξάνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό.

Αναλυτικότερα, παρατηρώντας το γράφημα της Εικόνας 11, όπου παρουσιάζεται ο αποικισμός του FsK στα φυτά (αντικατοπτρίζεται από το λόγο της σχετικής βιομάζας του μύκητα προς τη βιομάζα του φυτού), μπορούμε να δούμε ότι η προσθήκη ABA στα φυτά αγρίου τύπου δεν επηρεάζει σημαντικά το βαθμό αποικισμού των φυτών από τον FsK. Σημαντικά αυξημένο βαθμό αποικισμού έχουμε στην περίπτωση των *sitiens* φυτών στα οποία δεν εφαρμόζεται εξωγενής προσθήκη ABA. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πλέον πως **η παρουσία του ABA επιφέρει μείωση στην ικανότητα του ανταγωνιστικού μύκητα FsK να αποικίσει το φυτό**, όπως και στην περίπτωση των παθογόνων μυκήτων. Στην περίπτωση δε των *sitiens* φυτών στα οποία προσθέσαμε εξωγενώς ABA, ο αποικισμός μειώνεται σημαντικά και είναι στα ίδια επίπεδα με αυτόν των φυτών αγρίου τύπου, γεγονός που υποστηρίζει ότι η εξωγενής εφαρμογή ABA είναι ικανή να επαναφέρει τα *sitiens* φυτά σε επίπεδα συγκεντρώσεων ABA με αυτές των φυτών αγρίου τύπου όσον αφορά την επίδραση

του ABA στον βαθμό αποικισμού του FsK. Συνεπώς, η παρουσία αμπισσικού οξέος και στα *sitiens* φυτά μειώνει την ικανότητα του μύκητα να αποικίζει το φυτό.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η απουσία αντίληψης του αιθυλενίου οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αποικισμού των φυτών από τον FsK (Καβρουλάκης και Παπαδοπούλου, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Γνωρίζουμε, επίσης, ότι τα μεταλλάγματα της σειράς *sitiens* (λόγω απουσίας του ABA άρα και μειωμένης ανταγωνιστικότητας του με το αιθυλένιο) παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι πιθανόν η αλληλεπίδραση των δύο φυτοορμονών, ABA και αιθυλενίου, να οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα του μύκητα να αποικίσει τη ρίζα. Παρομοίως, σύμφωνα με αυτό το προτεινόμενο μοντέλο τα επίπεδα συγκέντρωσης ABA στο φυτό είναι υπεύθυνα ή σχετίζονται για την ανταγωνιστική δράση του FsK ενώ η δράση του αιθυλενίου πιθανόν να είναι δευτερογενής και συνέπεια της επιστατικής και ανταγωνιστικής δράσης του ABA στην παραγωγή και μηχανισμό δράσης του αιθυλενίου.

Στην Εικόνα 6, παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης θανάτων των φυτών και των δύο σειρών, σε 4 διαφορετικούς χειρισμούς για την κάθε μία. Είναι προφανής η ανταγωνιστική δράση του FsK ενάντια στον παθογόνο FORL, και αυτό το βλέπουμε κυρίως στα φυτά αγρίου τύπου RR όπου έχουμε μία πολύ μεγάλη στατιστική διαφορά στην εμφάνιση ασθένειας σε σχέση με τα φυτά που δεν έχουν εμβολιασθεί με τον FsK. Διαπιστώνουμε δε πως στα *sitiens* φυτά έχουμε μειωμένους θανάτους όταν υπάρχει προσθήκη ABA, άρα το ABA ενισχύει τη δράση του ωφέλιμου μύκητα FsK και μάλιστα είναι απαραίτητο για αυτή του τη δράση. Συνεπώς, η δράση του ωφέλιμου μύκητα εμφανίζεται μόνο παρουσία αμπισσικού οξέος.

Από τα αποτελέσματα επίσης διαπιστώνεται ότι ο FsK μύκητας επηρεάζεται από τη παρουσία ABA και μάλιστα θετικά, με αύξηση του μυκηλίου του σε *in vitro* καλλιέργειες. Επίσης, παρατηρείται και αύξηση του μύκητα στον πολλαπλασιασμό του (συγκέντρωση κονιδίων) με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του αμπισσικού οξέος. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη την αρνητική επίδραση του ABA στο βαθμό αποικισμού του φυτού από τον FsK προκύπτει ότι η διαμεσολάβηση του ABA στον αποικισμό του FsK δεν οφείλεται σε άμεση δράση του στον μύκητα αλλά προφανώς σε επίδρασή του στη γενικότερη απόκριση του φυτού. Αντιθέτως, η παρουσία ABA δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του παθογόνου μύκητα FORL.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει:

- το αμπισικό οξύ επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα αποικισμού του FsK μύκητα σε φυτά τομάτας. Η επίδραση αυτή δεν οφείλεται σε άμεση δράση του ABA στη φυσιολογία του μύκητα.
- το αμπισικό οξύ επιδρά θετικά στο μηχανισμό αμυντικής δράσης του μύκητα ενάντια σε παθογόνους μύκητες του εδάφους όπως ο εξεταστέος FORL
- ο βαθμός αποικισμού του φυτού από τον FsK δεν φαίνεται να έχει σημασία για την εκδήλωση της προστατευτικής δράσης του FsK καθώς τα φυτά της σειράς *sitiens* παρόλο που παρουσιάζουν το μέγιστο βαθμό αποικισμού από τον FsK δεν εμφανίζουν προστασία ενάντια στον παθογόνο μύκητα
- το αμπισικό οξύ είναι ίσως η ορμόνη που τελικά καθορίζει και τα αποτελέσματα δράσης και άλλων όπως αυτή του αιθυλενίου και θα ήταν πολύ χρήσιμη μία περεταίρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της καθώς και της αλληλεπίδρασής της με άλλες φυτοορμόνες σε αυτή την αλληλεπίδραση φυτού ξενιστή με τον ανταγωνιστή μύκητα..

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τζάμος Σ.Ε. 2004. Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- David De Vleeschauwer, Yinong Yang, Casiana Vera Cruz, and Monica Hofte. Absciscic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase-Mediated Repression of Ethylene Signaling¹. *Plant Physiology*, April 2010, Vol. 152, pp. 2036–2052.
- E. A. Achuo, E. Prinsen and M. Höfte Influence of drought, salt stress and absciscic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium Neolycopersici*, *Plant Pathology*, (2006) **55**, 178–18
- Jun Fan, Lionel Hill, Casey Crooks², Peter Doerner, and Chris Lamb* Absciscic Acid Has a Key Role in Modulating Diverse Plant-Pathogen Interactions Department of Disease and Stress Biology (J.F., C.C., C.L.) and Department of Metabolic Biology (L.H.), John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, United Kingdom; and University of Edinburgh, Institute of Molecular Plant Sciences, Edinburgh EH9 3JR, United Kingdom (P.D. Sheen, J. Mutational Analysis of Protein Phosphatase 2C Involved in Absciscic Acid Signal Transduction in Higher Plants. Sheen, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. 95(3): 975-980.
- Ricardo Aroca & Maria del Mar Alguacil & Paolo Vernieri & Juan Manuel Ruiz-Lozano. Plant Responses to Drought Stress and Exogenous ABA Application are Modulated Differently by Mycorrhization in Tomato and an ABA-deficient Mutant (Sitiens) *Microb Ecol* (2008) 56:704–719
- Rodriguez JA , Morcillo RL , Vierheilig H , Ocampo JA , Ludwig-Müller J , Garrido JM .Mycorrhization of the notabilis and sitiens tomato mutants in relation to absciscic acid and ethylene contents. *Physiol Plant*. 2010 167 (8) :606-13. Epub 2010 Jan 15.
- Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis Gl, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* 58 (14):3853-3864

- M. Akrami , A. M. Akrami , A. Sh. Sh. Ibrahimov , Doust Morad Zafari and E. Ibrahimov , Doust Morad Zafari και E. Valizadeh Valizadeh Control *Fusarium* Rot of Bean by Combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in Greenhouse Condition Year: 2009 | Volume: 4 | Issue: 3 | Page No.: 121-123
- M. I. Al-Masri¹ , M. S. Ali-Shtayeh² , Y. Elad³ , A. Sharon⁴ , P. Tudzynski⁵ and R. Barakat. Effect of Plant Growth Regulators on White Mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Bean and Cucumber. *J. Phytopathology* 150, 481–487 (2002).
- Nambara E, Marion-Poll A. (2005). "Abscisic acid biosynthesis and catabolism". *Annu Rev Plant Biol.* **56** : 165–185. doi : 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046 . PMID 15862093 .
- PM Swamy and Bruce N. Smith PM Swamy και Bruce Smith N. Department of Botany and Range Science, Brigham Young University, Provo, Utah 84602, USA
- Papadopoulou KK, Kavroulakis N, Tourna M, Aggelou I. (2005). Use of b-glucoronidase activity to quantify the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* during infection of tomato. *Journal of Phytopathology* 153:325-332
- Wu, Y., J. Kuzma, E. Marechal, *et al.* Wu, Γ., I. Kuzma, E. Marechal, *et al.* Abscisic Acid Signaling Through Cyclic ADP-Ribose in Plants. *Science*. 1997. 278(5346): 2126-2130.
- Taiz L. and Zeiger E. 2006 Plant Physiology, Fourth Edition.